

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年1月15日 (15.01.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/004772 A1

(51)国際特許分類:  
38/17, A61P 3/04, 3/10, 43/00

A61K 45/00,

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/008482

(22)国際出願日: 2003年7月3日 (03.07.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2002-197582 2002年7月5日 (05.07.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72)発明者: および  
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 乾 明夫 (INUI,Akio) [JP/JP]; 〒654-0153 兵庫県神戸市須磨区南落合1-20-4 Hyogo (JP). 浅川 明弘 (ASAKAWA,Akihiro) [JP/JP]; 〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町6-12-20-1101 Hyogo (JP).

(74)代理人: 杉本一夫, 外 (SHAMOTO,Ichiro et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

A1

(54) Title: REMEDY FOR DIABETES

WO 2004/004772

(54)発明の名称: 糖尿病治療剤

(57)Abstract: It is intended to provide a preventive or a remedy for diabetes which contains as the active ingredient a growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) antagonist; a method of lowering blood glucose level characterized by comprising administering a GHS-R antagonist; a preventive or a remedy for obesity which contains as the active ingredient a GHS-R antagonist; and an appetite controlling agent which contains as the active ingredient a GHS-R antagonist.

(57)要約: 本発明は成長ホルモン放出促進因子受容体 (GHS-R) アンタゴニストを有効成分として含有する糖尿病予防剤又は治療剤、及びGHS-Rアンタゴニストを投与することを特徴とする血糖値低下方法に関する。本発明はさらに、GHS-Rアンタゴニストを有効成分として含有する肥満予防剤又は治療剤、及びGHS-Rアンタゴニストを有効成分として含有する食欲抑制剤にも関する。

明細書  
糖尿病治療剤

技術分野

5 本発明は新規な糖尿病の予防剤又は治療剤に関する。さらに詳しくは、成長ホルモン放出促進因子受容体 (GHS-R) アンタゴニストを有効成分として含有する糖尿病の予防剤又は治療剤に関する。また、GHS-R アンタゴニストを投与することを特徴とする血糖値低下方法に関する。本発明はさらに、GHS-R アンタゴニストを有効成分として含有する肥満予防剤又は治療剤、及び GHS-R アンタゴニストを  
10 有効成分として含有する食欲抑制剤に関する。

背景技術

近年、わが国では食生活の欧米化に伴って”飽食の時代”をむかえ、また一方では自動車をはじめとする機械化文明の普及により、国民の間に広く慢性の運動不足状態が蔓延してきた。このような社会的背景の中で、最近の糖尿病人口の増加は驚異的で、今日その数は予備軍を含めると 500 万人とも 600 万人とも言われている。

糖尿病には 2 つのタイプがある。1 型糖尿病(インスリン依存型糖尿病 (I D D M))は小児や若い人に多く、ウイルスの感染などによりインスリンを作り分泌する胰臓のランゲルハンス島が破壊され、インスリンを全く分泌することができなくなり糖尿病になる病気である。一方、中高年に多い 2 型糖尿病(インスリン非依存型糖尿病 (N I D D M))は日本人の糖尿病のほとんど(約 95%) をしめ、インスリンの分泌量が低下しやすく糖尿病になりやすい体质を持っている人に、食べ過ぎ、運動不足、肥満、ストレス、加齢などのインスリンの作用を妨害するような引き金が加わって発症する。

糖尿病は肥満と深く関わっており、調査によると、インスリン非依存型糖尿病患者の約 2/3 が現在肥満であるあるいは過去に肥満を経験している。実際、肥満者ではインスリンの血糖低下作用が弱まっていることがわかっている。

肥満は世界中で、特に先進社会において益々一般化しつつある重要な健康問題

である。合衆国においては、成人の半数以上が体重過剰である。Allison らの報告では、1991年の合衆国の死亡数の約280000が肥満に帰せられるという (Allison DB et al., JAMA, 282:1530-1538, 1991)。肥満の病態生理は消費を超える過剰の栄養摂取の継続として知られている。脂肪含有量の高い「西洋式の食事」が肥満に対する危険性の増加と関連していることが示されている。

体重調節は摂食量とエネルギー消費のバランスが鍵を握り、両者のバランスが肥満、やせを引き起こす。1994年に発見されたレプチンが adiposity (体脂肪量蓄積) シグナルとして体重調節の根幹に関わることが明らかにされて以来、レプチンの下流に位置する、多くの新しい食欲調節に関与するペプチドが見いだされた。特に、それまで個々独立した機能としてしか捉えられていなかった視床下部由来の神経ペプチド群が、レプチンの下流でそれぞれが機能し、さらにこれらの神経ペプチド群相互間でも密に情報交換が行われていることがわかつてきた。

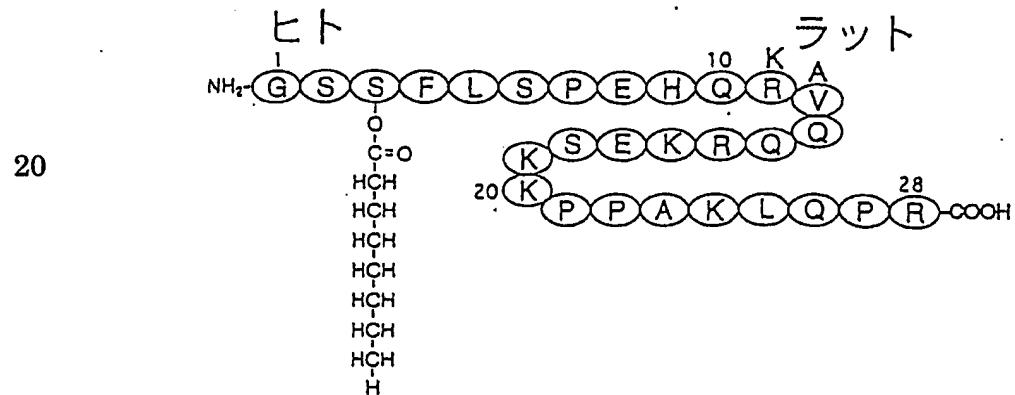
これらの神経ペプチドのうち、食欲を亢進する物質としては、ニューロペプチド Y (NPY)、オレキシン類 (orexins)、モチリン (motilin)、メラニン濃縮ホルモン (melanin-concentrating hormone : MCH) やアグウチ関連タンパク質 (agouti-related protein : AGRP) が知られている。また、食欲を抑制する物質としては、 $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone:  $\alpha$ -MSH)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin-releasing factor : CRF)、コカイン-及びアンフェタミン-制御転写物 (cocain- and amphetamine-regulated transcript : CART) やコレシストキニン (cholesystokinin: CCK) などが知られている。これらのペプチドは食欲を制御する生理学的メカニズムに関与しており、エネルギー恒常性に影響すると考えられている。

一方、成長ホルモン (GH) は、下垂体前葉から分泌されるホルモンであり、その分泌は巧妙に制御されており、視床下部の成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) によって刺激を受け、ソマトスタチンによって抑制される。近年、GHRH やソマトスタチンとは別の経路による GH 分泌調節機構が明らかになってきた。この別経路の GH 分泌調節機構は、GH の分泌促進活性をもつ合成化合物である成長ホルモン放出促進因子 (growth hormone secretagogue : GHS) の研究によ

り展開されてきた。GHSはGHRHとは異なる経路で作用する。すなわち、GHRHはGHRH受容体を活性化して、細胞内cAMP濃度を上昇させるのに対して、GHSはGHRH受容体とは異なる受容体を活性化して、細胞内IP3系を介して細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度を上昇させる。このGHSが作用する受容体であるGHS-Rは、1996年に発現クローニング法により構造が解明された(Howard A.D. et al., Science, 273: 974-977, 1996)。GHS-Rは細胞膜を7回貫通する典型的なGタンパク質共役型受容体であり、主として視床下部、下垂体に存在する。

さらに、生体内に存在しない合成化合物であるGHSを結合する受容体が存在することから、このGHS-Rに結合して、活性化する内因性のリガンドが探索された。その結果、GHS-Rに特異的なリガンドとして、グレリン(Ghrelin)がラットの胃から精製、同定された(Kojima M. et al., Nature, 402:656-660, 1999)。

グレリンは、アミノ酸28残基からなるペプチドで、3番目のセリン残基がn-オクタノイル化されている。また、ヒトのグレリンはラットグレリンとアミノ酸2残基が異なる。以下にラット及びヒトのグレリンの構造式を示す。



25

化学合成したグレリンはナノモルオーダーで、GHS-Rを発現させたCHO細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇活性や、初代培養下垂体細胞で成長ホルモンの放出活性をもつ。さらに、in vivoでもラットにおいて血中成長ホルモンを上昇させる。グレリンのmRNAは胃で顕著に発現しており、またグレリンは血中にも存在す

る。さらに、GHS-Rは視床下部、心臓、肺、脾臓、小腸や脂肪組織にも存在している（前記 Kojima ら）。また、グレリンには摂食促進作用のあることが報告されている（Wren et al., Endocrinology, 141(11):4325-4328, 2000）。本発明者らはグレリンがNPYとY1受容体を介して顕著な食欲促進作用を示すこと 5 を発見し、グレリンが低栄養症状を示す疾患の治療剤として有用であることを提案した（PCT/JP02/00765）。

### 発明の開示

本発明の目的は、新規な糖尿病の予防剤又は治療剤、及び肥満の予防剤又は治療剤を開発することである。本発明のさらなる目的は、新規な血糖値低下方法、 10 肥満予防剤又は治療剤、ならびに食欲抑制剤を提供することである。

本発明者らは、成長ホルモン放出促進因子受容体（GHS-R）アンタゴニストが血糖値を有意に低下させること、及び食欲を顕著に抑制することを発見して本発明を完成した。

15 すなわち、本発明は、成長ホルモン放出促進因子受容体（GHS-R）アンタゴニストを有効成分として含有する糖尿病の予防剤又は治療剤を提供する。

本発明はさらに、GHS-R アンタゴニストを投与することを特徴とする血糖値低下方法を提供する。

本発明はさらに、GHS-R アンタゴニストを有効成分として含有する肥満予防剤 20 又は治療剤を提供する。

本発明はさらに、GHS-R アンタゴニストを有効成分として含有する食欲抑制剤を提供する。

本発明はさらに、有効量の GHS-R アンタゴニストを投与することを含む糖尿病予防法又は治療法を提供する。

25 本発明はさらに、有効量の GHS-R アンタゴニストを投与することを含む肥満予防法又は治療法を提供する。

本発明はさらに、有効量の GHS-R アンタゴニストを投与することを含む食欲抑制法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、Aは、ヒトグレリンとヒトモチリンのアミノ酸配列を示したものである。Bは、ヒトグレリン受容体とヒトモチリン受容体のアミノ酸配列を示したものである。同じアミノ酸を星印で示す。

5 図2は、グレリンIP投与の高脂肪食餌下における体重に及ぼす効果を示す。

図3は、グレリンIP投与の高脂肪食餌下における脂肪体塊に及ぼす効果を示す。

図4は、グレリンIP投与後のWATにおけるレプチン、アジポネクチン及びレジスチンmRNAの発現（ノーザンプロットにて評価）を示す。

10 図5は、高脂肪食餌下でのグレリンmRNAの発現（ノーザンプロットにて評価）を示す。

図6は、[D-Lys-3]-GHRP-6をIP投与したときの餌摂取量に及ぼす効果を示す。

図7は、[D-Lys-3]-GHRP-6をICV投与したときの餌摂取量に及ぼす効果を示す。

15 図8は、IP投与されたグレリンとICV投与された[D-Lys-3]-GHRP-6の同時投与の餌摂取に及ぼす効果を示す。

図9は、[D-Lys-3]-GHRP-6をIP投与したときの胃排出速度に及ぼす効果を示す。

20 図10は、[D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11] substance PをIP投与したときの餌摂取量に及ぼす効果を示す。

図11は、[D-Lys-3]-GHRP-6をIP投与したときの餌摂取量に及ぼす効果を示す。

図12は、[D-Lys-3]-GHRP-6をIP投与したときのob/obマウスにおける餌摂取に及ぼす効果を示す。

25 図13は、[D-Lys-3]-GHRP-6の繰り返し投与がob/obマウスにおける体重増加に及ぼす効果を示す。

図14は、[D-Lys-3]-GHRP-6のIP投与がob/obマウスにおける遊離脂肪酸に及ぼす効果を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明で有効成分として用いる GHS-R アンタゴニストとは、GHS-R と結合してアゴニストの効果を阻害することのできる物質をいう。GHS-R アンタゴニストとしては、グレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストを用いることができる。

5 グレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストは、例えば以下に記載のスクリーニング方法によって同定することができる（PCT/JP02/00765 参照）。

すなわち、グレリン又はグレリン類似体の存在下又は非存在下に、候補物質を動物に投与し、摂食量、NPY mRNA 発現量、NPY と NPY の Y1 受容体 10 との結合量、酸素消費量、胃内容排出速度、又は迷走神経の活性を測定することにより、グレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストをスクリーニングすることができるが、これに限定されない。

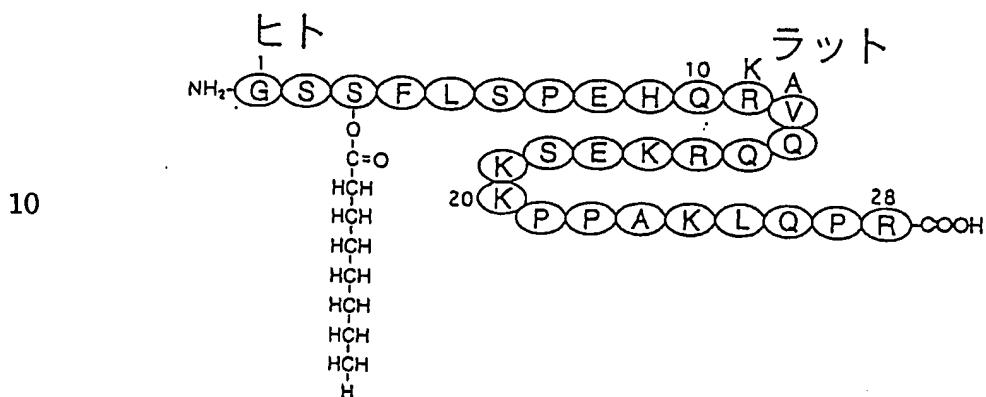
上記スクリーニング方法で得られたグレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストを本発明の糖尿病予防剤又は治療剤、肥満予防剤又は治療剤、及び食欲抑制 15 剤の有効成分として用いることができる。

本発明では、グレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストとしてモチリンもしくはモチリン類似体のアンタゴニストを用いることもできる。

モチリンは十二指腸、空腸上部の内分泌細胞から分泌される 22 アミノ酸残基のペプチドであり (Itoh, Z., Peptides, 18:593-608, 1997) 、消化管の空腹期 20 (interdigestive) 運動、胆囊収縮及び胃や脾臓からの酵素分泌に関与する。モチリンは GH 分泌を促進することが報告されており、非ペプチド性のモチリンアゴニストを用いて胃の運動を促進することが報告されている（前出、Itoh）。図 1 の A に示すように、ヒトグレリンとヒトモチリンは互いに 36 % のアミノ酸同一性を示す（アクセス番号 A59316 及び P12872）。さらに、図 1 の B に示すように、ヒトグレリン受容体はヒトモチリン受容体と全体として 50 % のアミノ酸同一性を示す（アクセス番号 Q92847、Q92848 及び Q43193）。また、最近になって、Tomasetto たちもマウス胃から新規なペプチドを単離したが、これはグレリンと同一であり、モチリン関連ペプチドと命名した (Tomasetto C. et al., Gastroenterology, 119:395-405, 2000)。グレリンと

モチリンとの配列相同性及びグレリン受容体とモチリン受容体との配列相同性に鑑み、グレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストとしてモチリンもしくはモチリン類似体のアンタゴニストを用いることができる。

なお、グレリンは、式1で表されるラットグレリン又はヒトグレリン又はグレ  
5 リン類似体である。



15

本発明にいうグレリン類似体には、食欲促進作用を有する限り、28個のアミノ酸の1個以上のアミノ酸が欠損、置換または付加されているものも包含され、さらに、これらの各種誘導体〔例えば、ペプチド構成アミノ酸が置換された誘導体（アミノ酸間に基、例えば、アルキレンが挿入されたものも包含する）及びエ  
20 ステル誘導体〕も包含される。

グレリン又はグレリン類似体はいかなる方法で製造したものでもよく、例えば、ヒト、ラットの細胞より分離、精製したもの、合成品、半合成品、遺伝子工学により得られたものなどを含み、特に制限はない。

28個のアミノ酸の1個以上のアミノ酸が欠損、置換または付加されているもの例としては、グレリンの14番目のGln残基が欠除した、des-Gln14-グレリンなどが代表的である。ラットdes-Gln14-グレリンはグレリン遺伝子のスプライシングの違いにより生じるものであり、ラット胃においてはグレリンの4分の1程度存在し、成長ホルモン放出活性の強さは同じである。

さらに、グレリン類似体には、J. Med. Chem. 2000, 43, 4370-4376に記載された

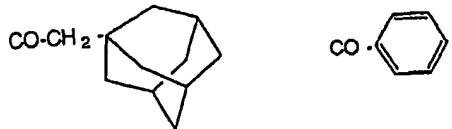
さらに、グレリン類似体には、J. Med. Chem. 2000, 43, 4370-4376 に記載された下記のようなものも包含される。例えば、グレリン28個のアミノ酸のうち、N末端から3及び4番目のアミノ酸(好ましくは、N末端4個のアミノ酸)を有し、かつN末端から3番目のアミノ酸(Ser)の側鎖が置換されているペプチド及びその誘導体であって、成長ホルモン遊離促進作用を有するものがあげられる。

N末端から3番目のアミノ酸の側鎖の例としてはグレリンの側鎖であるオクタノイル以外のアシル基及びアルキル基(これらの炭素数は6~18が好ましい)があげられる。具体的な側鎖としては、下記のものがあげられる:

10  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{COPh}$ 、

下記式:

15



N末端から3及び4番目のアミノ酸を有し、かつN末端から3番目のアミノ酸(Ser)の側鎖が置換されているグレリン類似体の具体的な例としては、第37回ペプチド討論会(2000年10月18日~20日)で報告された化合物:

20  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO-Ser}$ (オクチル)-Phe-Leu-NH- $(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ があげられる。

本発明では、GHS-Rアンタゴニストとして、[D-Lys-3]-GHRP-6(Veeraragavan K. et al., Life Sci. 50: 1149-55, 1992)及び[D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11] substance P(Cheng, K et al., Journal of Endocrinology, 152: 155-158, 1997)を用いて本発明の効果を確認した。

本発明の予防剤又は治療剤、及び抑制剤は中枢投与(例えば脳室内投与、脊髄腔注)とすることも、末梢投与とすることも可能である。好ましくは、末梢投与で使用する。食欲調節ペプチドの多くは末梢投与では中枢投与のような作用を示さないが、本発明の予防剤又は治療剤、及び抑制剤は末梢投与でも血糖濃度を有

意に低下させた。従って、本発明の予防剤又は治療剤、及び抑制剤は投与に伴う患者の苦痛が少なく、かつ簡便に服用することができ、従来の食欲調節性ペプチドに比べてはるかに利点が大きい。

- GHS-R アンタゴニストは、公知の製剤技術により、単独であるいは薬理学的に受容しうる担体、添加剤などとともに、通常の経口投与用製剤及び非経口投与用製剤とすることができます。例えば、溶液製剤（動脈注、静脈注又は皮下注などの注射剤、点鼻剤、シロップ剤等）、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、座剤などに製剤化することができる。また、ドラッグデリバリーシステム（除放剤など）で使用することも可能である。
- 10 本発明の予防剤又は治療剤、及び抑制剤の投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与経路などに応じて異なり、医師の判断によって決定される。通常、静脈内投与のためには、GHS-R アンタゴニストとして、体重 1 kgあたり約 0.1 μg～1000 mg、好ましくは約 0.01 mg～100 mg、より好ましくは 0.1 mg～10 mg である。但し、投与量はこれに限定されるものではない。
- 15 本発明の糖尿病予防剤又は治療剤は、糖尿病の予防又は治療に用いることができ、特に 2 型糖尿病 (NIDDM: インスリン非依存型糖尿病) の予防剤又は治療剤として有用である。本発明の肥満治療剤は、肥満に由来する虚血性心疾患、変形性関節症、腰椎症、脂質代謝異常、睡眠時無呼吸症候群、月経異常などの病態に有効である。本発明の食欲抑制剤は、過食症、ストレス過食、糖尿病性過食などの病態に有効である。
- 20

本発明者らは、後述する実施例に記載するように、体重、脂肪質量、グルコース、インシュリン、及び白色脂肪組織におけるレプチン (leptin)、アジポネクチン (adiponectin)、レジスチン (resistin) 遺伝子発現を、高脂肪食餌下でのグレリンの繰り返し投与の後に測定した。また、胃のグレリン遺伝子発現をノーザンプロット分析により測定した。さらに、エネルギー摂取及び胃排出 (gastric emptying) は GHS-R アンタゴニスト投与の後に測定した。GHS-R アンタゴニストの繰り返し投与を o b/o b 肥満マウスで 6 日間継続して行い、その効果を試験した。

その結果、グレリンは高脂肪食餌下で明らかな脂肪蓄積 (adiposity) を引き起

こし血糖制御を悪化させた。グレリンはレプチンmRNA発現を上昇させ、かつレジスタンmRNA発現を減少させた。胃グレリンmRNA発現は高脂肪食餌により増加した。

GHS-Rアンタゴニストは瘦マウス (lean mice) において、食餌誘導性 (diet-induced) 肥満のマウスにおいて、そしてob/ob肥満マウスにおいてエネルギー摂取を減少させたが、その作用の機構は胃排出の減少に関連している。GHS-Rアンタゴニストの繰り返し投与はob/obマウスにおいて体重増加を減少させ血糖制御を向上させた。

従って、グレリンは特に高脂肪食餌下における過剰な体重増加、脂肪蓄積及びインシュリン抵抗性に密接に関連していることが確認された。さらに、GHS-Rアンタゴニストは、肥満及び2型糖尿病のための有望な予防又は治療剤となることが期待できる。

#### GHS-Rアンタゴニストの摂食に対する作用についての考察

GHR-Rアンタゴニストがエネルギーの負平衡 (negative energy balance) 状態を誘導するであろうという予測に基づいて、GHS-Rアンタゴニストの摂食に対する作用を検討した。GHS-Rの投与により瘦マウス及び高脂肪食によって肥満となったマウスにおいて摂食が減少した。過去の報告によれば、GHS-Rは視床下部、心臓、肺、すい臓、小腸及び脂肪組織に存在している。視床下部ではGHS-Rは弓状核 (ARC) に位置しており、ここでは2つの食欲増進ペプチド、ニューロペプチドY (NPY) 及びアゴウチ関連タンパク (AGRP) がニューロンで合成されている。さらに、非ペプチドGH分泌促進物質が視床下部に作用してARCニューロンの電気的活性を変化させ、c-fosの発現を活性化するように作用している (例えば、Lawrence et al., Endocrinology, 143:155-162, 2002)。今までに、その作用メカニズムがARC内 (ここでは血液脳閂門障壁の作用が弱い) の視床下部NPY及びAGRPニューロンの直接的活性化に関するような摂食行動をグレリンが刺激することが報告されている (例えば、Inui, Nat Rev Neurosci, 2:551-560, 2001)。しかしながら、胃からのグレリンシグナルの別の経路は、迷走神経と脳幹核 (brainstem nuclei) を通り最後に視床下部に到達する上行神経ネットワークを介する。本発明において、中枢

に投与された GHS-R アンタゴニストは末梢投与されたグレリンにより誘導された摂食に対する刺激作用を停止した。これらの結果によりグレリンが脳内で GHS-R を通じて作用しているらしいことが示唆された。さらに、末梢で投与された GHS-R アンタゴニストが胃排出速度を減少させることを明らかにしたが、このことはその食欲不振誘発作用（食欲抑制作用）に寄与する。かなりの証拠が蓄積して、胃の拡張が満腹シグナルとして作用して食物摂取を阻害し、速やかな胃排出が過食と肥満に関連し、遅滞した胃排出が食欲不振と悪液質に関連することが示されている (Inui, Mol Psychiatry, 6:620-624, 2001)。過去の研究によりグレリンが迷走神経性経路を介して胃排出速度及び運動性を増加することが示されている (Inui, Nat Rev Neurosci, 2:551-560, 2001)。

本発明により、摂食行動の制御において GHS-R がある役割を持ち、GHS-R の拮抗作用が肥満の治療のための有望なアプローチとなりうることが示された。

さらに、本発明により、末梢に投与された GHS-R アンタゴニストが○b/○b マウス（インシュリン抵抗性及び速やかな胃排出で肥満及び糖尿病の遺伝モデルとして知られる）において食欲不振作用を生起し、体重減少と血糖濃度を低下させることを明らかにした。この中程度の血清インシュリンレベルの減少を伴ったグルコースレベルの著しい減少により、インシュリン抵抗性の改善における GHS-R アンタゴニストの役割が示された。他方、フォスファチジルイノシトール 3 キナーゼ活性の減少に関する作用メカニズムのグルコース輸送活性の阻害を通じて、血清 FFA の上昇によりインシュリン抵抗性が誘導されることが示された。最近、循環性 FFA 濃度の上昇が中年男性の突然死の独立危険因子となることが、長期間のコホート調査において報告された (Jouven et al., Circulation, 104:756-761, 2001)。以下に示す実施例では、GHS-R アンタゴニストは○b/○b 肥満マウスの FFA レベルの顕著な減少を起こした。

結論として、末梢で投与された GHS-R アンタゴニスト、[D-Lys-3]-GHRP-6 及び[D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11] substance P により、瘦マウス、食餌誘導性肥満マウスおよび○b/○b 肥満マウスにおける食料摂取が減少することを見出した。また、[D-Lys-3]-GHRP-6 の繰り返し投与により、マウスにおいて体重増加が減少し、血糖制御が向上することを示した。

本出願は特願2002-197582に基づく優先権を主張するものであり、前記出願の内容の全てを参考として本出願に包含する。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。  
5

### 実施例

#### 試験材料と方法

##### (1) 動物実験

10 ddy系のオスのマウス(34-37g, JAPAN SLC, Shizuoka, Japan)及びobese(ob/ob)C57BL/6Jマウス(68-74g, Shionogi Co., Ltd., Shiga, Japan)を使用した。マウスは1匹ずつ制御された環境中で収容された(22±2°C, 55±10%湿度、12:12時間の明:暗サイクルで午前7:00にライトをつけた)。マウスは全エネルギーの12%を脂肪として含む標準食餌又は全エネルギーの45%を脂肪として含む高脂肪食餌(CLEA Japan, INC., Tokyo, Japan)を与えられた。他に記載しない限り餌と水は自由に摂取できた。全実験は我々の大学の動物ケア委員会により承認された。  
15

##### (2) 試験薬剤

[D-Lys-3]-GHRP-6、[D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11] substance P  
20 及びラットグレリンは BACHEM CALIFORNIA INC. (Torrance, California)、NEOSYSTEM (Strasbourg, France)及び Peptide Institute(Osaka, Japan)からそれぞれ購入した。投与の直前に、各薬剤は第三脳室内(ICV)投与のために4μlの人工脳脊髄液(ACSF)中あるいは腹膜内(IP)投与のために100μl生理食塩水中に希釈された。結果は平均値±s.e.mで表した。分散分析(ANOVA)に続くBonferroni's t testを用いてグループ間の差を評価した。P<0.05で統計的に有意とされた。  
25

##### (3) ICVによる薬剤投与

ICV投与のために、マウスをペントバルビタールナトリウム(80-85mg/kg IP)で麻酔し、実験前の7日間、定位固定装置(SR-6, Narishige,

Tokyo, Japan) 内において。各頭蓋骨に、針を使って中央縫合の側方 0. 9 mm で前頂の 0. 9 mm 後方に穴をあけた。一端を長さ 3 mm にわたって傾斜させた 24 ゲージのカニューレ (Safelet-Cas, Nipro, Osaka, Japan) を第三脳室に埋め込み I C V 投与用とした。カニューレを歯科用セメントで頭蓋骨に固定し、シリコンでふたをした。27 ゲージの注入用インサートを P E - 20 チューピングでミクロシリンジに取り付けた。

#### (4) 摂食試験

摂食試験の前に、マウスは水は自由に飲めたが 16 時間絶食 (food deprived) した。ただし、[D-Lys-3]-GHRP-6 及びグレリンの共投与の餌摂取に対する影響の実験においてはマウスは餌と水を自由に摂取した。餌摂取は投与後 20 分間、1, 2 及び 4 時間で、初めに前もって測定しておいた餌から食べられていない餌を減算することにより測定した。

#### (5) RNA 分離及びノーザンプロット分析

RNA は胃及び精巣上体脂肪から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて分離した。全 RNA をホルムアルデヒドで変性し、1% アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N<sup>+</sup>メンブレン上にプロットした。メンブレンをフルオレセンス標識 cDNA プローブでハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションシグナルのトータルの積分密度 (total integrated densities) はデンシトメトリー (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) により求めた。データはグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (G 3 P D H) mRNA 存在度 (abundance) に標準化されて対照に対するパーセンテージとして示した。

#### (6) グレリン遺伝子の発現

瘦マウスは全エネルギーの 12% を脂肪として含む標準食餌あるいは全エネルギーの 45% を脂肪として含む高脂肪食餌を 2 週間摂取した。マウスは 8 時間絶食してから頸部脱臼により殺された。その後に胃を取り除き、ドライアイス上で凍結し -80 °C でノーザンプロットの調製まで保存した。

#### (7) 胃排出

胃排出における実験の前に、マウスは水分は自由に摂取しながら 16 時間絶食した。絶食したマウスは予め秤量したペレットを 1 時間自由に摂取してから [D-

Lys-3]-GHRP-6 を投与された。マウスには注入の後、再び 1 又は 2 時間餌を与えた。餌の摂取は食べられなかったペレットを秤量することにより測定した。マウスは実験開始から 2 又は 3 時間後に頸椎脱臼により殺された。直後に、開腹により胃が露出され、幽門と噴門の両方で素早く結紮され、それから取り除かれ、そして乾燥内容物の重量を測定した。胃排出は以下の式により算出した：

5 胃排出 (%) = { 1 - (胃から取り出された餌の乾燥重量 / 摂取した餌の重量) }  
X 100

#### (8) 繰り返し投与

瘦マウスにおいて高脂肪食餌又は標準食餌下で 5 日間、及び o b / o b 肥満マウスにおいて標準食餌下で 6 日間、繰り返し I P 投与をそれぞれ継続した。マウスは午前 7 : 00 と午後 19 : 00 に投与を受けた。餌の摂取と体重を毎日測定した。実験の終わりに（餌の除去及び最終 I P 投与後 8 時間）、エーテル麻酔下で眼窩洞 (orbital sinus) から得られた血液から血清を分離した。マウスは頸椎脱臼により殺された。直後に、白色脂肪組織 (WAT) として査定された精巣上体脂肪体 (fat pad) 塊 (mass)、及び腓腹筋を取り除き、重量を測定した。血中グルコースをグルコースオキシダーゼ法により測定した。血清インシュリンと遊離脂肪酸 (FFA) をそれぞれ酵素免疫法及び酵素法 (EIKEN CHEMICAL CO., LTD., Tokyo, Japan) により測定した。血清トリグリセリドと全コレステロールを酵素法 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan) により測定した。

20 実施例 1：高脂肪食餌下における体重増加及び血糖制御に対するグレリン繰り返し投与の作用

一日 2 回 5 日間のグレリンの I P 投与（1 回投与量：3nmol / マウス）により、一日のエネルギー摂取の増加に伴い体重が有意に増加した（図 2、図 3、表 1）。脂肪体塊は、標準食餌及び高脂肪食餌を与えられた生理食塩水処理のマウスと比較してそれぞれ 49 % 及び 125 % 有意に増加した。骨格筋は重量の増加を示さなかった。血清コレステロール及びインシュリンレベルも増加し、血中グルコース濃度の中程度の増加を伴った。次に WAT におけるレプチン、アジポネクチン及びレジスタンの mRNA レベルを測定した。グレリンの繰り返し投与により WAT においてレプチン mRNA の発現が増加するとともにレジスタン mRNA の

ATにおいてレプチンmRNAの発現が増加するとともにレジスタンmRNAの発現が減少した（図4）。

次に、全エネルギーの45%を脂肪として含む高脂肪食餌下でのグレリンmRNAの発現を測定した。2週間の高脂肪食餌により、餌剥奪マウスの胃における

5 グレリン遺伝子の発現は、標準食餌と比較して有意に増加した（図5）。

表1

	LF, 生理食塩水	HF, 生理食塩水	HF, グレリン
カロリー摂取 (kcal/day)	18.83 ± 1.055	23.22 ± 1.329	25.94 ± 2.562 *
脂肪体塊 (g)	0.533 ± 0.049	0.797 ± 0.095	1.202 ± 0.175 ** #
骨格筋 (g)	0.337 ± 0.016	0.353 ± 0.010	0.340 ± 0.005
グルコース (mg/dl)	142.3 ± 8.578	151.2 ± 14.86	160.5 ± 8.977
インシュリン (ng/ml)	0.900 ± 0.134	1.183 ± 0.087	2.520 ± 0.945 *
コレステロール (mg/dl)	144.7 ± 13.03	215.3 ± 19.22 *	224.8 ± 19.69 **
トリグリセリド (mg/dl)	30.67 ± 2.860	27.00 ± 3.454	32.80 ± 7.965
遊離脂肪酸 (meq/l)	1.467 ± 0.050	1.623 ± 0.100	1.636 ± 0.047

注：表中、結果は平均±標準偏差で示す。LF及びHFはそれぞれ標準食餌及び高脂肪食餌を示す。

\*P<0.05、\*\*P<0.01は、標準食餌を摂った生理食塩水処理マウスと、高脂肪食餌を摂ったグレリン処理マウスの間の有意さを示す。

#P<0.05は、高脂肪食餌を摂った生理食塩水処理マウスと、高脂肪食餌を摂ったグレリン処理マウスの間の有意さを示す。

## 実施例 2 : G H S - R アンタゴニストがエネルギーバランスに及ぼす影響

G H S - R アンタゴニスト、[D-Lys-3]-GHRP-6 を餌剥奪マウスに I P 投与した。図 6 に示すように、[D-Lys-3]-GHRP-6 により有意に用量依存的に餌摂取が減少した。

5 次いで、中枢投与の [D-Lys-3]-GHRP-6 が同様の効果を持つかどうかについても検討した。I C V 並びに I P 投与された [D-Lys-3]-GHRP-6 により、摂食行動の強力な減少が起こった（図 7）。

10 グレリンが脳内の G H S - R を介して作用する可能性を評価するために、グレリンと [D-Lys-3]-GHRP-6 の同時投与の餌摂取に対する効果を調べた。I C V 投与された [D-Lys-3]-GHRP-6 はグレリンの I P 投与により誘導された摂食に対する刺激効果を阻害した（図 8）。

次に胃排出速度に対する [D-Lys-3]-GHRP-6 の I P 投与の効果を調べた。末梢投与された [D-Lys-3]-GHRP-6 により、胃排出速度の有意な減少が、投与の 1 時間後に起こった（図 9）。

15 別の G H S - R アンタゴニスト、[D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11] substance P (L-756,867) の摂食に対する効果についても餌剥奪マウスで調べた。末梢投与された [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11] substance P は [D-Lys-3]-GHRP-6 と同様に用量依存的に餌摂取を有意に減少させた（図 10）。

20 高脂肪食餌によって引き起こされた体重増加が賦形剤の繰り返し投与により大幅に損なわれたため（図 2）、食餌により肥満となったマウスにおける [D-Lys-3]-GHRP-6 の急性作用を検討した。[D-Lys-3]-GHRP-6 の I P 投与により餌の摂取は大きく減少し、体重増加が減少した（図 11）。

25 治療効果についてさらに見通しを得るために、I P 投与された [D-Lys-3]-GHRP-6 が o b / o b マウスにおいて食欲不振誘発性作用を產生するかどうか検討した。投与された [D-Lys-3]-GHRP-6 は、o b / o b マウス並びに瘦マウスにおいて餌摂取を有意に減少させた（図 12）。

最後に、[D-Lys-3]-GHRP-6 の繰り返し投与が o b / o b マウスにおける体重増加と血糖制御に与える影響を検討した。[D-Lys-3]-GHRP-6 の繰り返し注射により、筋肉重量を減少することなく体重増加と血糖濃度が有意に低下した（図 13、表

2)。さらに、[D-Lys-3]-GHRP-6 処理により *o b/o b* マウスのFFAレベルは生理食塩水処理 *o b/o b* マウスに比較して24%有意に減少した(図14)。

表2

	生理食塩水	20 nmol	200 nmol
食餌摂取 (kcal/day)	4.845 ± 0.160	4.527 ± 0.261	4.285 ± 0.298
脂肪体塊 (g)	0.974 ± 0.066	0.897 ± 0.169	0.860 ± 0.086
骨格筋 (g)	0.300 ± 0.012	0.314 ± 0.009	0.326 ± 0.013
グルコース (mg/dl)	234.4 ± 27.71	217.3 ± 27.90	134.9 ± 19.47 *
インシュリン (ng/ml)	55.29 ± 11.17	41.61 ± 10.85	36.54 ± 8.695
コレステロール (mg/dl)	257.1 ± 13.38	219.0 ± 11.24	228.4 ± 21.84
トリグリセリド (mg/dl)	45.86 ± 4.378	38.57 ± 3.551	41.14 ± 5.990
遊離脂肪酸 (meq/l)	2.164 ± 0.075	2.036 ± 0.121	1.646 ± 0.078 **

注: \*P<0.05、\*\*P<0.01は、生理食塩水処理コントロール間の有意さを示す。

## 請求の範囲

1. 成長ホルモン放出促進因子受容体 (GHS-R) アンタゴニストを有効成分として含有する糖尿病予防剤又は治療剤。
- 5 2. GHS-R アンタゴニストがグレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストである、請求項 1 記載の予防剤又は治療剤。
3. 末梢投与用である請求項 1 又は 2 記載の予防剤又は治療剤。
4. GHS-R アンタゴニストを投与することを特徴とする血糖値低下方法。
5. GHS-R アンタゴニストを有効成分として含有する肥満予防剤又は治療剤。
- 10 6. GHS-R アンタゴニストを有効成分として含有する食欲抑制剤。
7. 有効量の GHS-R アンタゴニストを投与することを含む糖尿病予防法又は治療法。
8. 有効量の GHS-R アンタゴニストを投与することを含む肥満予防法又は治療法。
9. 有効量の GHS-R アンタゴニストを投与することを含む食欲抑制法。

A

グレリン モチリン	1:--GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	28
	1:FV-PFIFTYGELORMQE-KERNKGQ-----	22
	*	** *

B

グレリン受容体 (GHSR)	1:MWNATPSEEPGFNLTLDLDWASPGNDLQLGDELLQFPAPLLAGVTATCVALFVGIAGNILTMLVVSERELRTTNYLSSMAFSDLIIFLCMPQLDL	100
モチリン受容体	1:M--GSPWNGSDGPEGAREPPWPALP--PC-DERRCSFPFLGALYPTAVCLCFVNGSGANVTVMILGTYRDMDRTTTNLYGSMMAVSDDLILLGLPFDL	95
	*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	
グレリン受容体 (GHSR)	101:VRLWQYRPINFGDLLCKLFQVFSESCYATVLVLTIALSVERYAICCPFLRAKVWTGKRVKLVIFIVIWAACSAAGPTIVLVGVEHE-----	190
モチリン受容体	96:YRLWRSRPWFGPLLCRSLYVGECTYATLHLMTALSVERYLAICRPLRARVLVTRRRCALIAVWALLSAGPFLFLVGVEQDPGISWPGINGTA	195
	*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	
グレリン受容体 (GHSR)	191:-----D-P-W-D-T-NEC--R-P-T-E----FA--VR-S-G-L--LTWVWVSSIFFLPVFCLTIVYSLIGRKLIWRRRGDAVVGASLRDQNHKQ	260
モチリン受容体	196:RIASSPLASSPPLWLSRAPPSPPSGPETAAALFSRECSPSPAQLGALRMLWVTTAYFFLPFLCLSLIYGLIGRELYWSSRPLRGPAAASGREGRHRQ	295
	*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	
グレリン受容体 (GHSR)	261:TVKMLAVVWFafilcwlPFHVGRLFSKSFFPGSLETAQISQYCNIVSFVLFYLSAAINPILYNIMSKKRYAVFRLLGFFPFSQRKLSTLKDESSRAWT	360
モチリン受容体	296:TVRVLVVLAFTICWLPFHVGRIYTNT-EDSRM-NY-FYQYNTVALQFLYLASASINPILYNILSKKRYAAFKLLARKSRPRGFFHRSROTAGEVAG	392
	*** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	
グレリン受容体 (GHSR)	361:ESSINT-----	366
モチリン受容体	393:DtgGDTVGYTETSANVKTMG	412
	*	

図 2

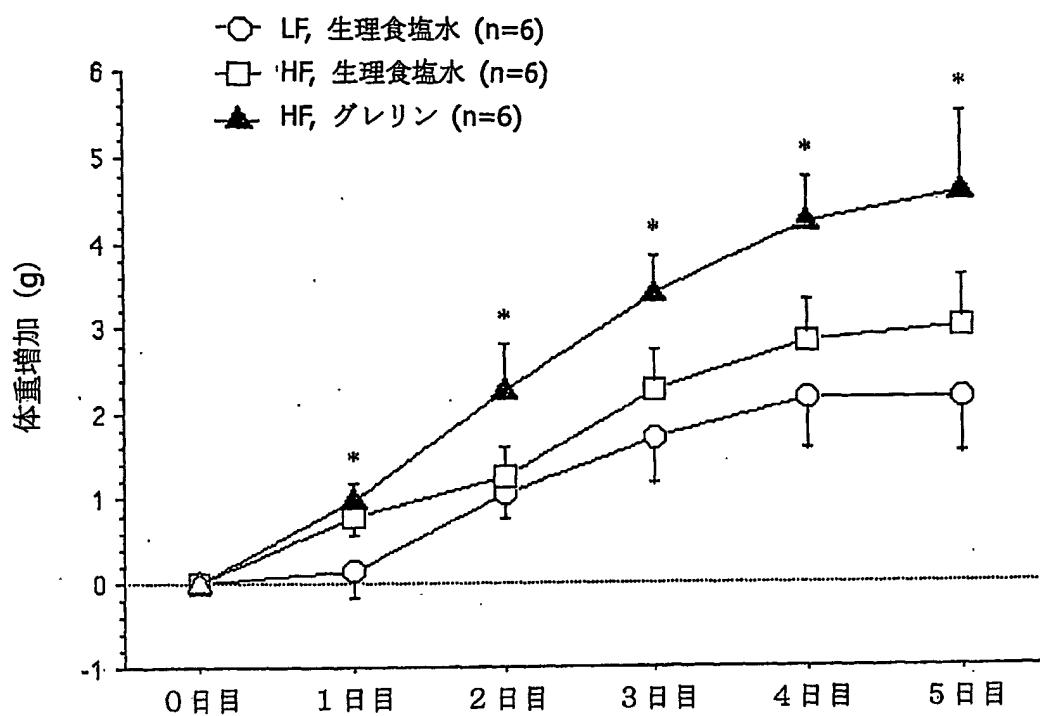


図 3

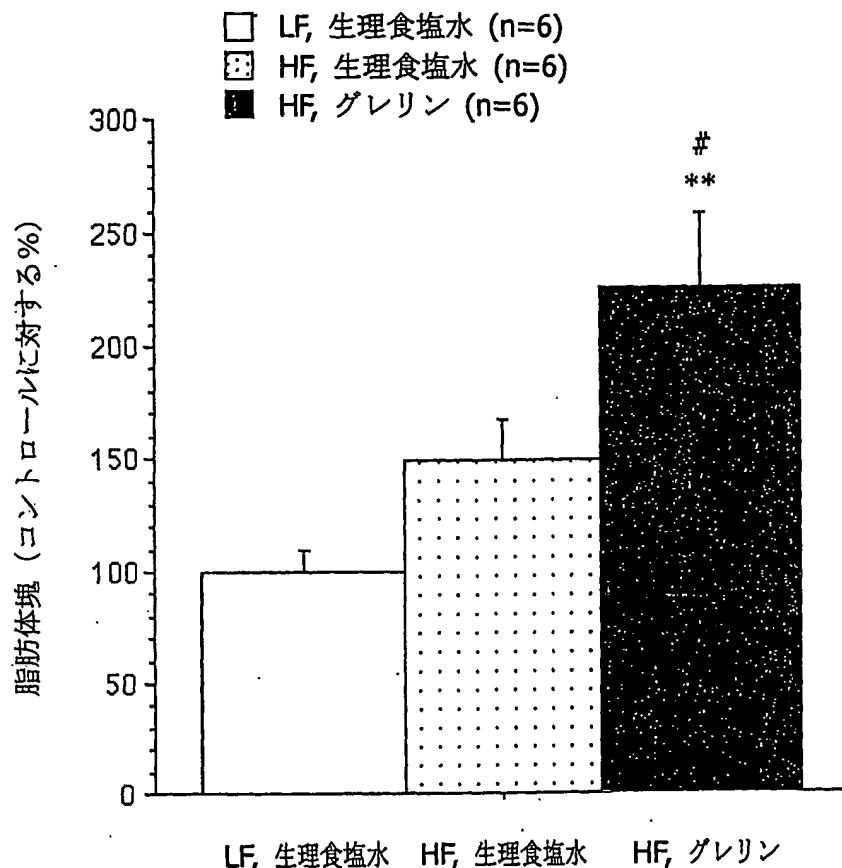


図 4

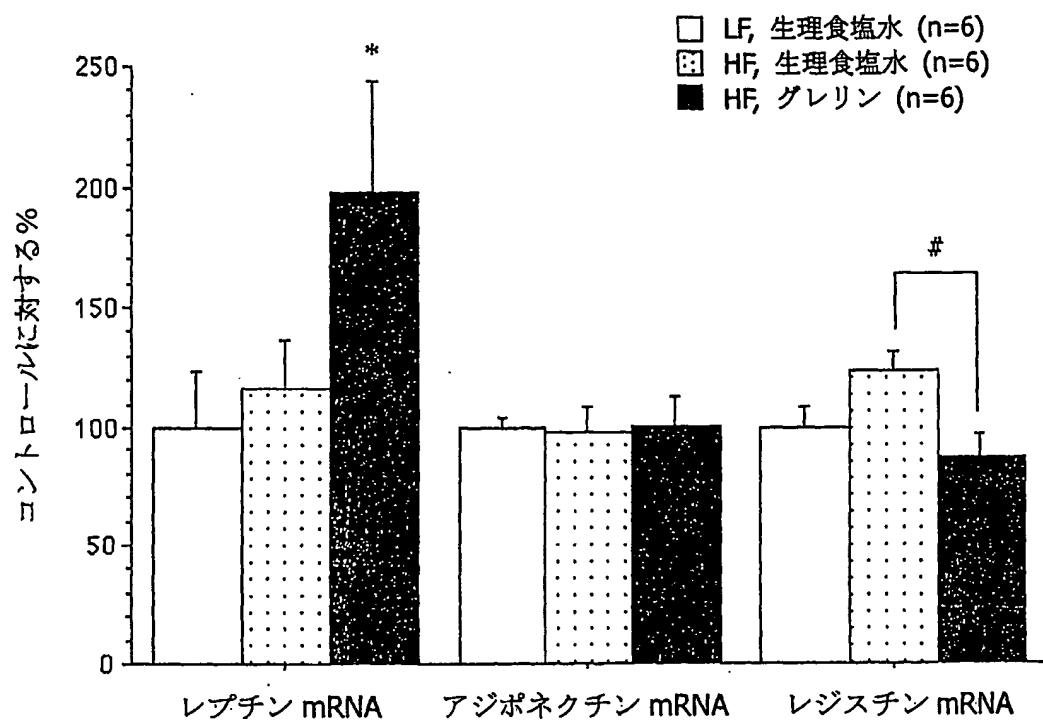


図 5

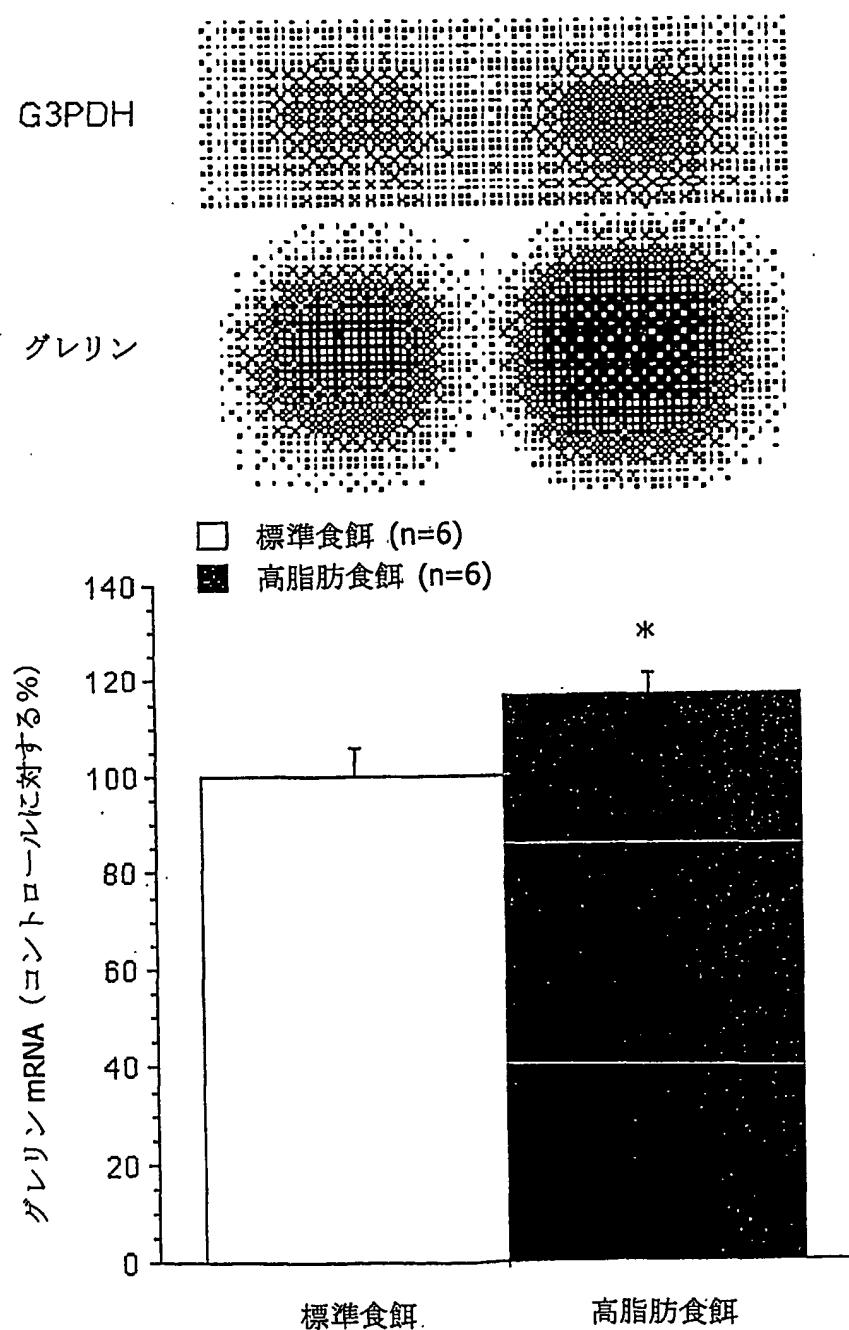


図 6

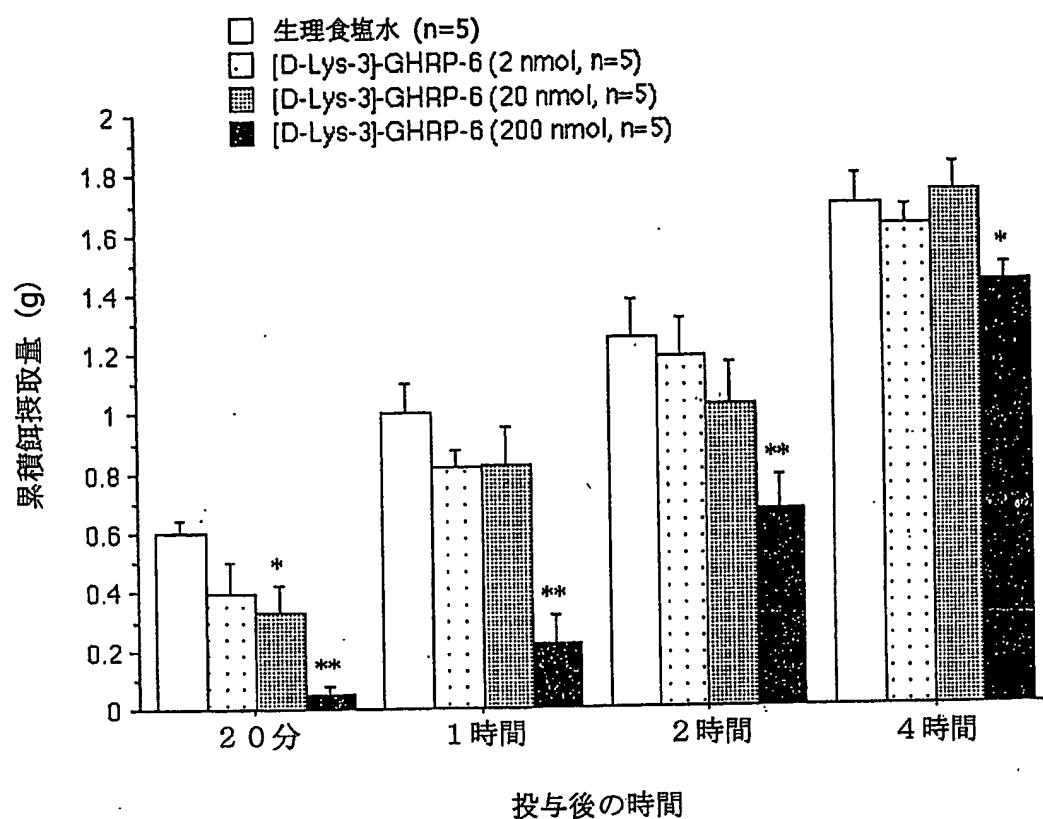


図 7

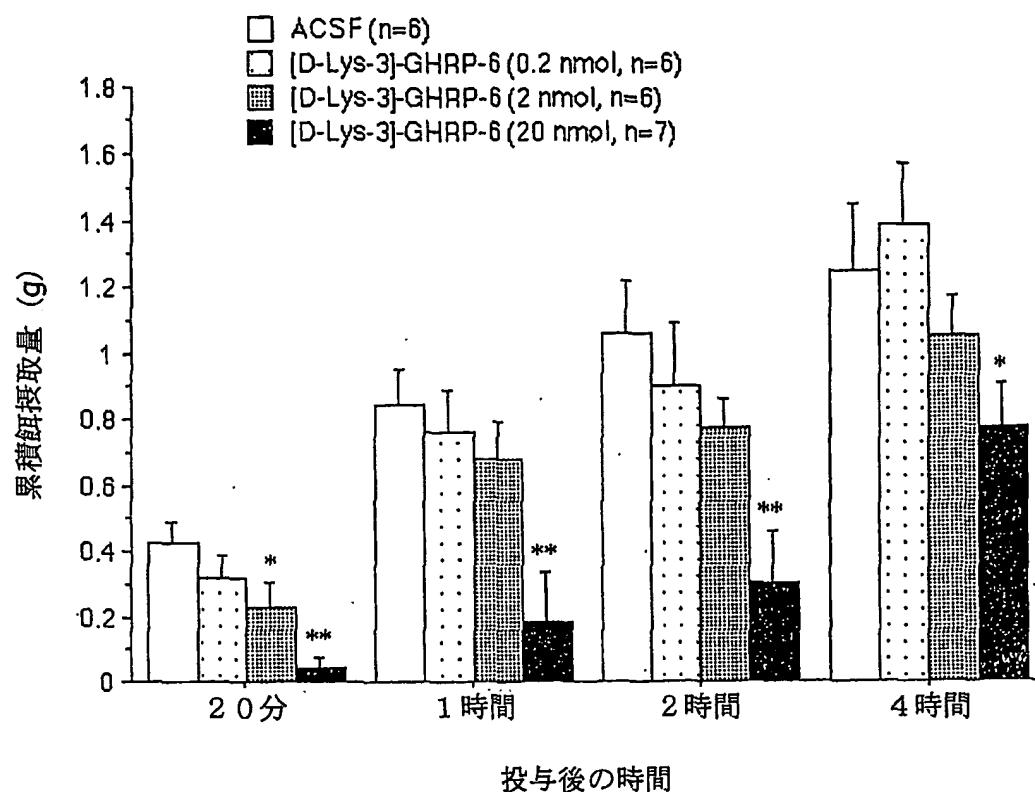


図 8

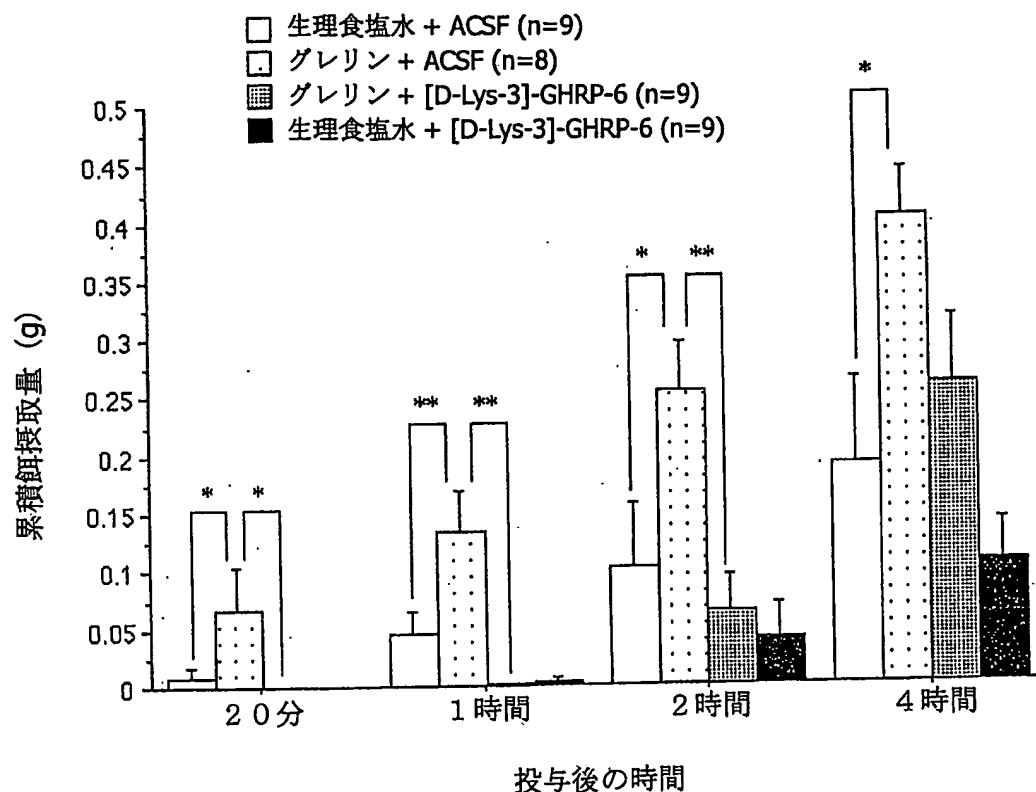


図 9

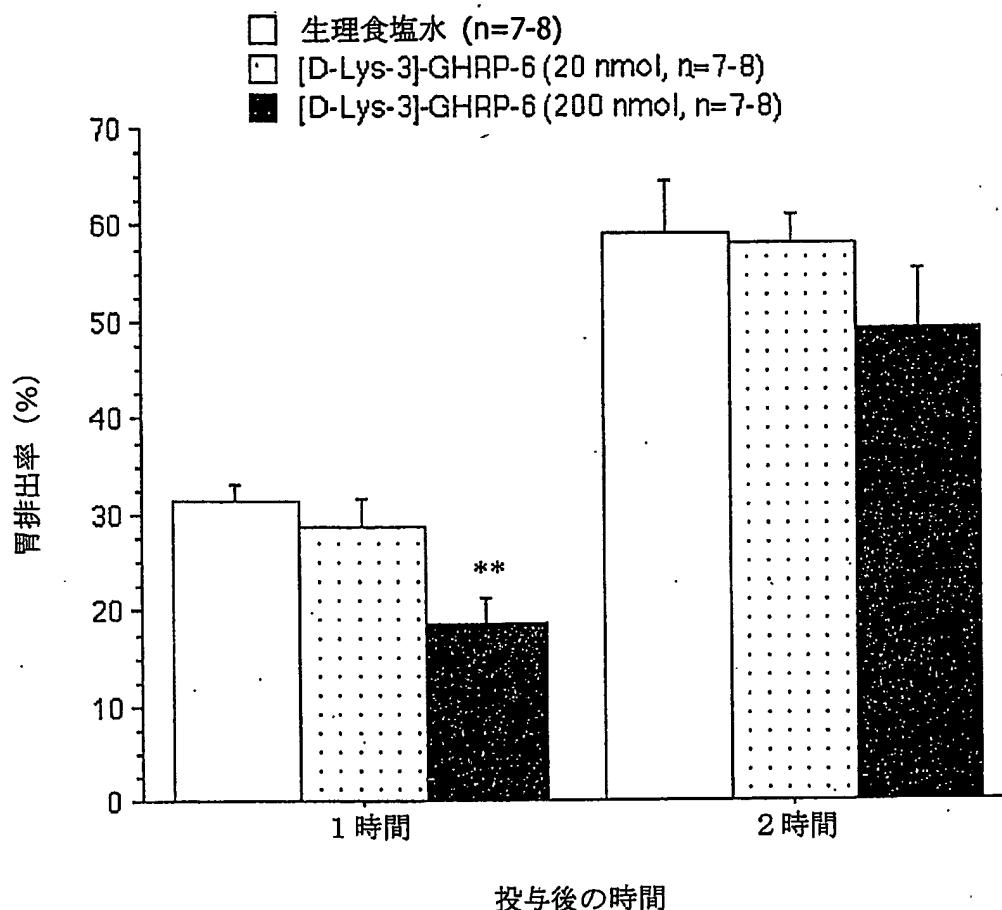


図 10

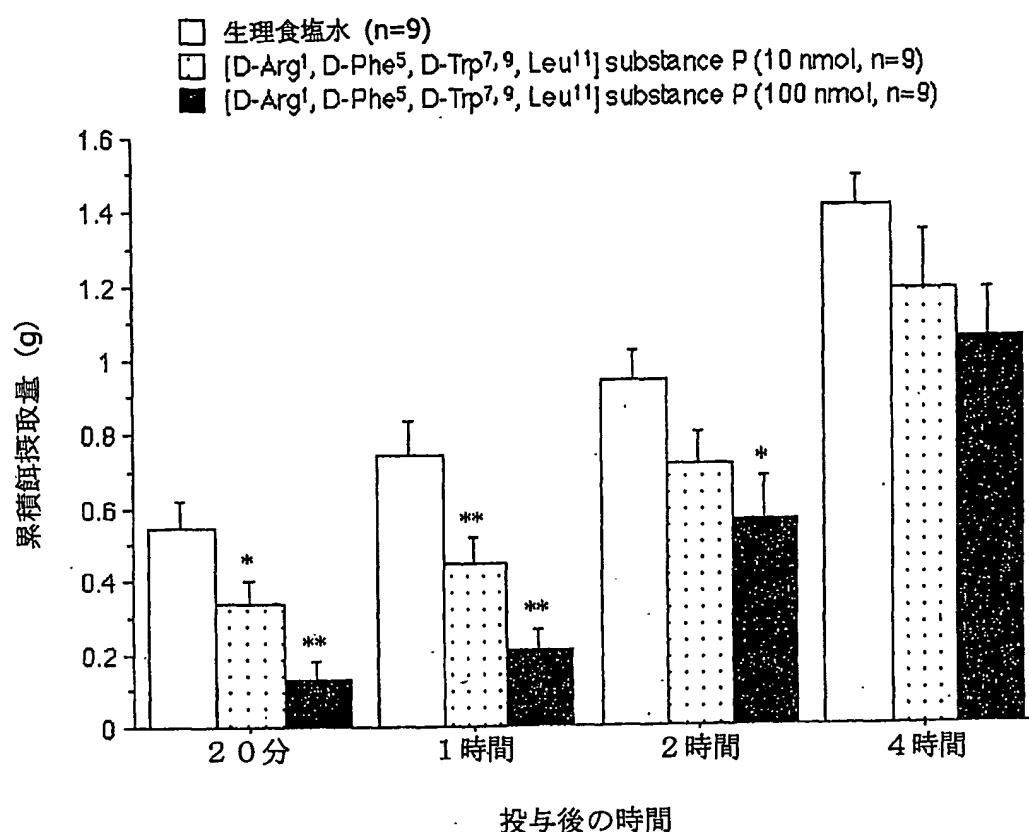


図 1 1

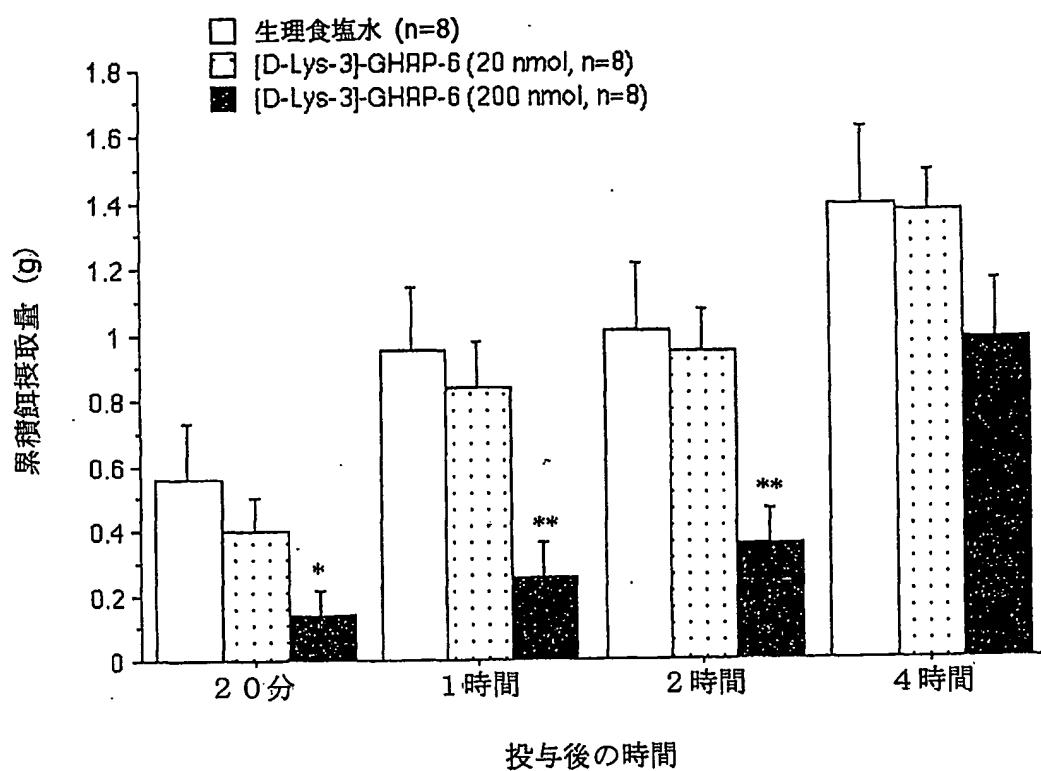


図 1 2

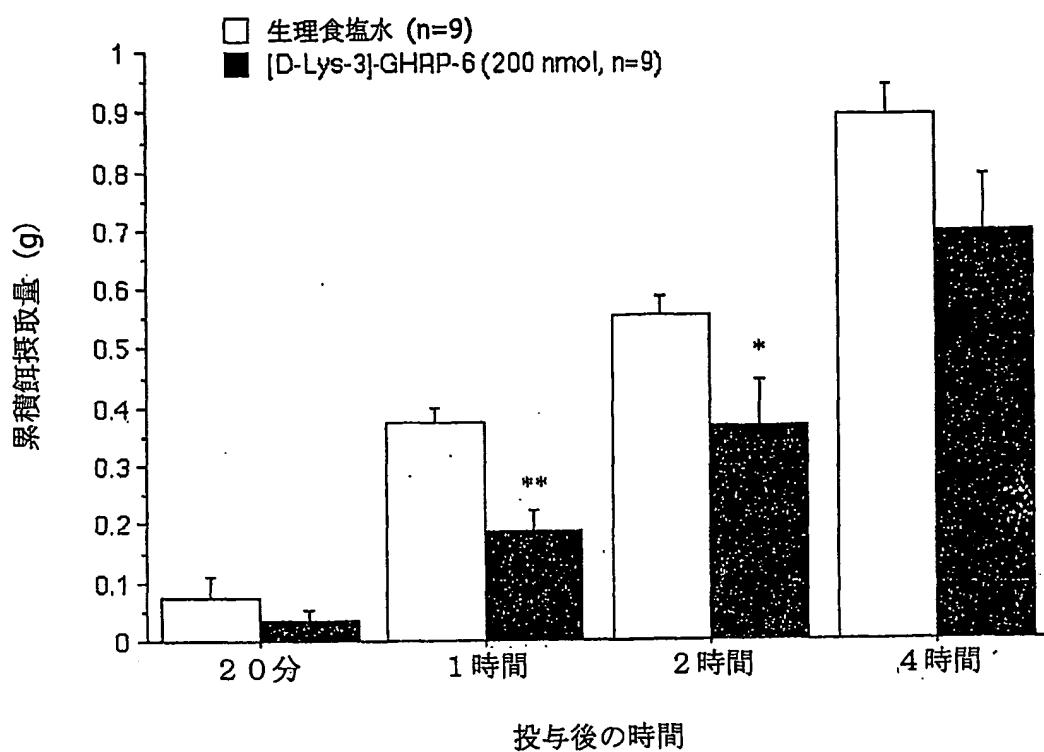


図 13

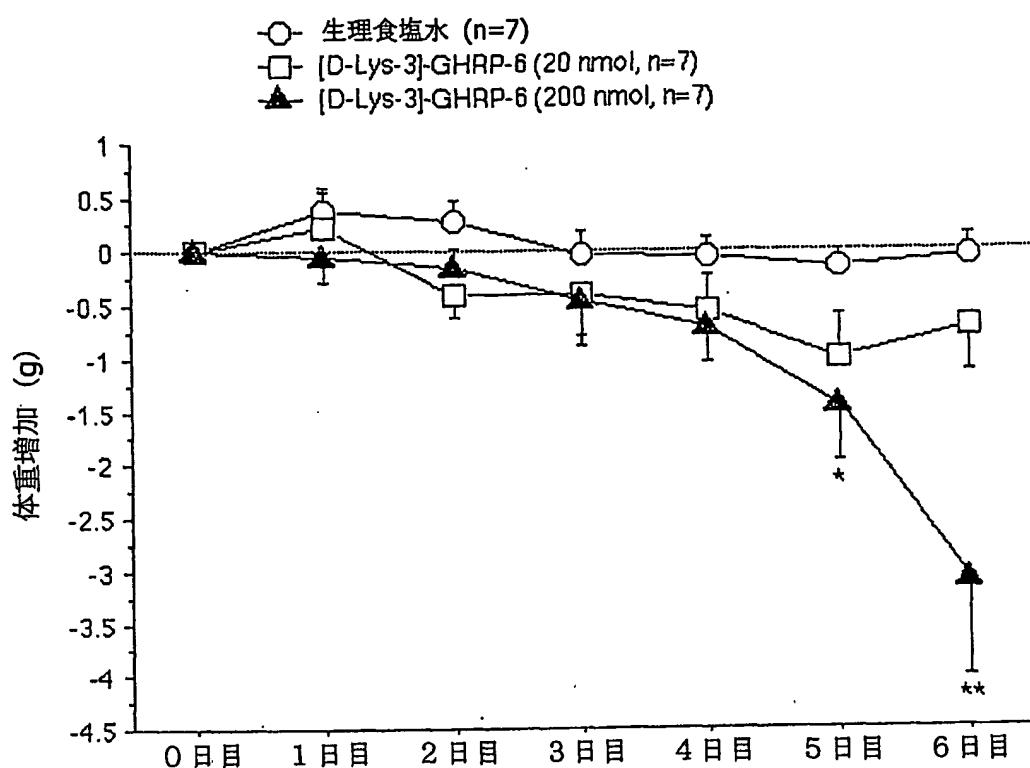
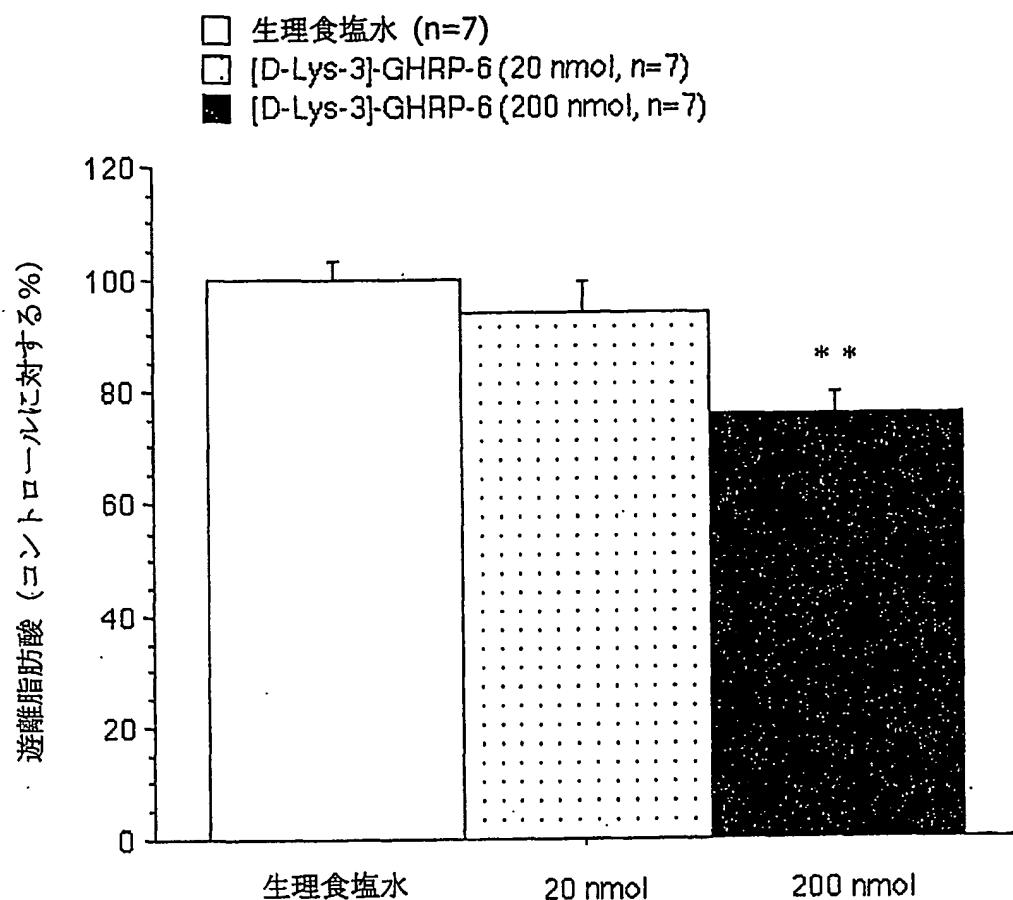


図 14



## 配列表

&lt;110&gt; 中外製薬株式会社

&lt;120&gt; 糖尿病治療剤

&lt;130&gt; Yct-842

5 &lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

15 20 25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

20 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys

1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Gly Gln

25 20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Trp Asn Ala Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Phe Asn Leu Thr Leu  
1 5 10 15

5 Ala Asp Leu Asp Trp Asp Ala Ser Pro Gly Asn Asp Ser Leu Gly Asp  
20 25 30

Glu Leu Leu Gln Leu Phe Pro Ala Pro Leu Leu Ala Gly Val Thr Ala  
35 40 45

Thr Cys Val Ala Leu Phe Val Val Gly Ile Ala Gly Asn Leu Leu Thr  
10 50 55 60

Met Leu Val Val Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Thr Thr Thr Asn Leu  
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Ser Met Ala Phe Ser Asp Leu Leu Ile Phe Leu Cys Met  
85 90 95

15 Pro Leu Asp Leu Val Arg Leu Trp Gln Tyr Arg Pro Trp Asn Phe Gly  
100 105 110

Asp Leu Leu Cys Lys Leu Phe Gln Phe Val Ser Glu Ser Cys Thr Tyr  
115 120 125

Ala Thr Val Leu Thr Ile Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Phe Ala  
20 130 135 140

Ile Cys Phe Pro Leu Arg Ala Lys Val Val Val Thr Lys Gly Arg Val  
145 150 155 160

Lys Leu Val Ile Phe Val Ile Trp Ala Val Ala Phe Cys Ser Ala Gly  
165 170 175

25 Pro Ile Phe Val Leu Val Gly Val Glu His Glu Asn Gly Thr Asp Pro  
180 185 190

Trp Asp Thr Asn Glu Cys Arg Pro Thr Glu Phe Ala Val Arg Ser Gly  
195 200 205

Leu Leu Thr Val Met Val Trp Val Ser Ser Ile Phe Phe Leu Pro

210                    215                    220  
Val Phe Cys Leu Thr Val Leu Tyr Ser Leu Ile Gly Arg Lys Leu Trp  
225                    230                    235                    240  
Arg Arg Arg Arg Gly Asp Ala Val Val Gly Ala Ser Leu Arg Asp Gln  
5                        245                    250                    255  
Asn His Lys Gln Thr Val Lys Met Leu Ala Val Val Phe Ala Phe  
260                    265                    270  
Ile Leu Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Tyr Leu Phe Ser Lys  
275                    280                    285  
10 Ser Phe Glu Pro Gly Ser Leu Glu Ile Ala Gln Ile Ser Gln Tyr Cys  
290                    295                    300  
Asn Leu Val Ser Phe Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ala Ile Asn Pro  
305                    310                    315                    320  
Ile Leu Tyr Asn Ile Met Ser Lys Lys Tyr Arg Val Ala Val Phe Arg  
15                        325                    330                    335  
Leu Leu Gly Phe Glu Pro Phe Ser Gln Arg Lys Leu Ser Thr Leu Lys  
340                    345                    350  
Asp Glu Ser Ser Arg Ala Trp Thr Glu Ser Ser Ile Asn Thr  
355                    360                    365  
20  
<210> 4  
<211> 412  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 4  
Met Gly Ser Pro Trp Asn Gly Ser Asp Gly Pro Glu Gly Ala Arg Glu  
1                        5                        10                        15  
Pro Pro Trp Pro Ala Leu Pro Pro Cys Asp Glu Arg Arg Cys Ser Pro  
20                        25                        30

Phe Pro Leu Gly Ala Leu Val Pro Val Thr Ala Val Cys Leu Cys Leu  
35 40 45

Phe Val Val Gly Val Ser Gly Asn Val Val Thr Val Met Leu Ile Gly  
50 55 60

5 Arg Tyr Arg Asp Met Arg Thr Thr Thr Asn Leu Tyr Leu Gly Ser Met  
65 70 75 80

Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Leu Pro Phe Asp Leu Tyr  
85 90 95

Arg Leu Trp Arg Ser Arg Pro Trp Val Phe Gly Pro Leu Leu Cys Arg  
10 100 105 110

Leu Ser Leu Tyr Val Gly Glu Gly Cys Thr Tyr Ala Thr Leu Leu His  
115 120 125

Met Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro Leu  
130 135 140

15 Arg Ala Arg Val Leu Val Thr Arg Arg Arg Val Cys Ala Leu Ile Ala  
145 150 155 160

Val Leu Trp Ala Val Ala Leu Leu Ser Ala Gly Pro Phe Leu Phe Leu  
165 170 175

Val Gly Val Glu Gln Asp Pro Gly Ile Ser Val Val Pro Gly Leu Asn  
20 180 185 190

Gly Thr Ala Arg Ile Ala Ser Ser Pro Leu Ala Ser Ser Pro Pro Leu  
195 200 205

Trp Leu Ser Arg Ala Pro Pro Pro Ser Pro Pro Ser Gly Pro Glu Thr  
210 215 220

25 Ala Glu Ala Ala Ala Leu Phe Ser Arg Glu Cys Arg Pro Ser Pro Ala  
225 230 235 240

Gln Leu Gly Ala Leu Arg Val Met Leu Trp Val Thr Thr Ala Tyr Phe  
245 250 255

Phe Leu Pro Phe Leu Cys Leu Ser Ile Leu Tyr Gly Leu Ile Gly Arg

	260	265	270
	Glu Leu Trp Ser Ser Arg Arg Pro Leu Arg Gly Pro Ala Ala Ser Gly		
	275	280	285
	Arg Glu Arg Gly His Arg Gln Thr Val Arg Val Leu Leu Val Val Val		
5	290	295	300
	Leu Ala Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Ile Ile		
	305	310	315
	Tyr Ile Asn Thr Glu Asp Ser Arg Met Met Tyr Phe Tyr Gln Tyr Phe		
	325	330	335
10	Asn Ile Val Ala Leu Gln Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ser Ile Asn Pro		
	340	345	350
	Ile Leu Tyr Asn Leu Ile Ser Lys Lys Tyr Arg Ala Ala Phe Lys		
	355	360	365
	Leu Leu Leu Ala Arg Lys Ser Arg Pro Arg Gly Phe His Arg Ser Arg		
15	370	375	380
	Asp Thr Ala Gly Glu Val Ala Gly Asp Thr Gly Gly Asp Thr Val Gly		
	385	390	395
	Tyr Thr Glu Thr Ser Ala Asn Val Lys Thr Met Gly		
	405	410	

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08482

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, A61P3/04, 3/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00-38/58, 45/00-45/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), CAplus (STN)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/92292 A2 (MERCK & CO., INC.), 06 December, 2001 (06.12.01), See especially, page 6, lines 7 to 15 & US 2003/0186844 A1	1-3, 5, 6
X	WO 01/87335 A2 (ELI LILLY AND CO.), 22 November, 2001 (22.11.01), See especially, Claim 16 and page 6, lines 24 to 26 & AU 200159056 A & EP 1286697 A2	5, 6
P, X	WO 02/060472 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 August, 2002 (08.08.02), Particularly, Claim 7; page 8, line 23 to page 9, line 3 (Family: none)	5, 6

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 October, 2003 (07.10.03)Date of mailing of the international search report  
04 November, 2003 (04.11.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08482

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ASAKAWA, A. et al., Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice, Gut, 01 July, 2003 (01.07.03), Vol.52, No.7, pages 947 to 952	1-3, 5, 6
A	WREN, A.M. et al., The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake And Growth Hormone Secretion., Endocrinology, November, 2000, Vol.141, No.11, pages 4325 to 4328	1-3, 5, 6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/08482

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 4, 7-9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 4 and 7 to 9 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1' A61K45/00, 38/17, A61P3/04, 3/10, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1' A61K38/00-38/58, 45/00-45/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG) MEDLINE (STN) EMBASE (STN)  
CAplus (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/92292 A2 (MERCK & CO., INC.) 2001.12.06 See especially page 6 lines 7-15. & US 2003/0186844 A1	1-3, 5, 6
X	WO 01/87335 A2 (ELI LILLY AND COMPANY) 2001.11.22 See especially claim 16 and page 6 lines 24-26. & AU 200159056 A & EP 1286697 A2	5, 6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.10.03

国際調査報告の発送日

04.11.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

内田俊生



4 P 8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 02/060472 A1 (中外製薬株式会社) 2002.08.08 特に、請求の範囲7 及び 8ページ23行から9ページ3行を参照。 (ファミリーなし)	5, 6
P, X	ASAKAWA, A. et al., Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice, Gut, July 1, 2003, Volume 52, Number 7, pages 947-952	1-3, 5, 6
A	WREN, A.M. et al., The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake And Growth Hormone Secretion., Endocrinology, November, 2000, Volume 141, Number 11, pages 4325-4328	1-3, 5, 6

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 4, 7-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

つまり、

請求の範囲 4, 7-9 に記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当する。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。